

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Lidija Salkić**

6990/PT

**PRIMJENA 2D – KORELACIJSKE SPEKTROSKOPIJE U**

**ANALITICI HRANE**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet:** Instrumentalna analiza

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

**Zagreb, 2018.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju**

**Laboratorij za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

## **PRIMJENA 2D – KORELACIJSKE SPEKTROSKOPIJE U ANALITICI HRANE**

**Lidija Salkić, 0119019439**

**Sažetak:** Ovaj rad daje pregled dosad objavljenih znanstvenih radova vezanih uz primjenu dvodimenzijske (2D) korelacijske spektroskopije u analitici hrane. Također, u radu je dan kratak pregled općeg principa 2D korelacijske spektroskopije te su istaknute njene prednosti u usporedbi s klasičnim analitičkim metodama. Pregledom su obuhvaćeni dosad objavljeni znanstveni radovi koji su se bavili analizom mlijeka u prahu, alkoholnih pića, mesa, žitarica, jabuka i vina. Iako je 2D korelacijska spektroskopija relativno nova metoda u analitici hrane, pokazala se korisnom i pouzdanom metodom za analizu kompleksnih uzoraka, pa će u budućnosti zasigurno imati širu primjenu.

**Ključne riječi:** 2D – korelacijska spektroskopija, analitika hrane

**Rad sadrži:** 20 stranica, 13 slika, 24 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

**Datum obrane:** 2. srpnja 2018.

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University Undergraduate study Food Technology**

**Department of Chemistry and Biochemistry**

**Laboratory for General and Inorganic Chemistry and Electroanalysis**

**Scientific area: Biotechnological Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

## **APPLICATION OF 2D - CORRELATION SPECTROSCOPY IN FOOD ANALYSIS**

**Lidija Salkić, 0119019439**

**Abstract:** This thesis gives a review of the published scientific papers related to the application of two-dimensional (2D) correlation spectroscopy in the field of food analysis. Also, a short insight was given into the general principles of 2D correlation spectroscopy and its advantages over classical methods of analysis. The review covers the published scientific papers related to the analysis of powdered milk, alcoholic beverages, meat, grains, apples and wine. 2D correlation spectroscopy, although being a relatively new method in food analysis, proved as a useful and reliable analytical method for analysis of complex samples, and will surely have much wider usage in the foreseeable future.

**Keywords:** 2D – correlation spectroscopy, food analysis

**Thesis contains:** 20 pages, 13 figures, 24 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Damir Iveković, Associate professor

**Defence date:** July 2<sup>nd</sup>, 2018.

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. DVODIMENZIJSKA KORELACIJA SPEKTROSKOPIJA .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Sinhroni 2D korelacijski spektar .....	3
2.1.2. Asinhroni 2D korelacijski spektar .....	4
2.1.3. Heterospektralna 2D korelacija .....	5
<b>2.2. PRIMJENA DVODIMENZIJSKE KORELACIJE U ANALITICI HRANE .....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Mlijeko u prahu .....	5
2.2.2. Alkoholna pića .....	8
2.2.3. Meso .....	9
2.2.4. Žitarice .....	12
2.2.5. Jabuke .....	14
2.2.6. Vino .....	16
<b>3. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>18</b>
<b>4. LITERATURA .....</b>	<b>19</b>

## 1. UVOD

Hrana predstavlja složeni heterogeni sustav biokemijskih komponenti. Metabolizmom hrane organizmu osiguravamo potrebnu količinu energije i spojeva za pravilno funkcioniranje. U prošlosti, hrana se konzumirala neposredno nakon branja ili klanja životinja, ali u modernom dobu, većina hrane na tržištu je produkt prehrambene industrije.

Razvojem prehrambene industrije pojavila se potreba za analizom hrane. Analiza hrane uključuje utvrđivanje sastava i svojstava prehrambenog proizvoda, procjenu kvalitete, sigurnosti i stabilnosti te senzorsko ocjenjivanje (McGorin, 2009.). Obzirom da je krajnji cilj dobiti proizvod optimalne kvalitete, analiza se provodi konstantno tijekom procesa, što uključuje analizu ulaznih sirovina, međuprodukata te gotovog proizvoda (Nielsen, 2017.).

Tijekom pojedinih etapa analize hrane, potrebno je odabrati one metode analize koje će biti brze, precizne i točne te također i financijski isplative. Samo neki od primjera su korištenje visokorazlučivih kromatografskih tehnika (HPLC i GC), nuklearne magnetske rezonancije (NMR), masene spektrometrije (MS), spektrometrije u bliskom infracrvenom području (NIR) i dr. Kako se razvija znanost, tako se svakim danom pronalaze i nove metode kako bi analiza bila još kvalitetnija.

Jedna od novijih metoda jest dvodimenzijaska (2D) korelacijska spektroskopija. Iako je prvenstveno osmišljena za analizu polimera u kemijskoj industriji, ubrzo je svoju primjenu pronašla i u analitici hrane zbog svojih prednosti u odnosu na klasične analitičke metode. 2D korelacijskom spektroskopijom je omogućeno pojednostavljenje kompleksnih spektara sastavljenih od velikog broja preklopljenih signala, poboljšanje spektralne rezolucije, određivanje povezanosti među pojedinim signalima te određivanje kronološkog slijeda zbivanja (promjena) u nekom sustavu ili procesu.

Cilj ovog rada je napraviti pregled do sada objavljenih radova na području primjene 2D korelacijske spektroskopije u analitici hrane te predstaviti 2D korelacijsku spektroskopiju kao korisnu i djelotvornu metodu u tom području.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. DVODIMENZIJSKA KORELACIJA SPEKTROSKOPIJA

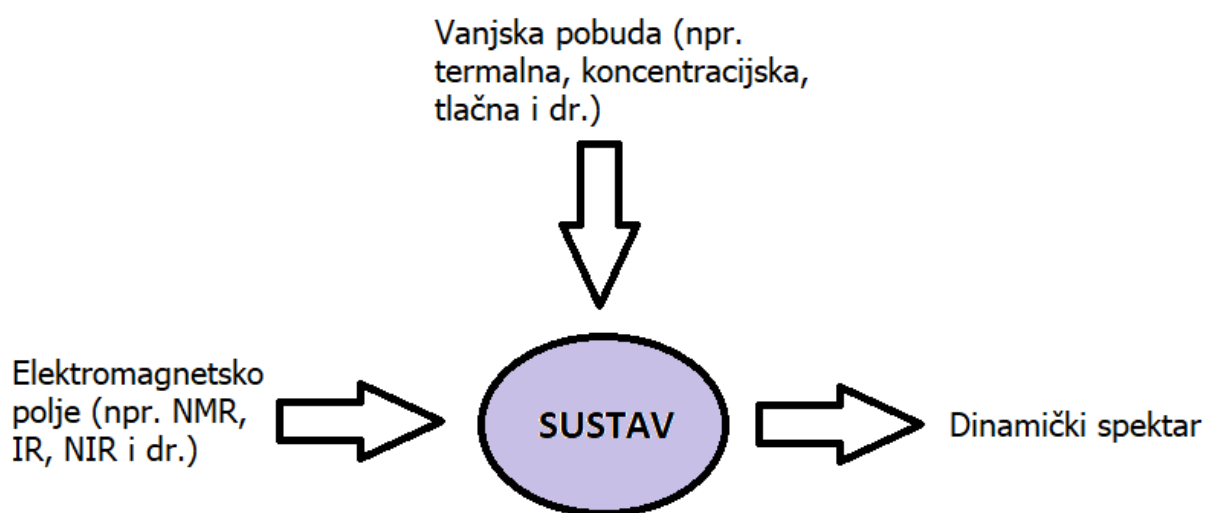
Dvodimenzijska (2D) korelacijska spektroskopija predstavlja korisnu analitičku metodu, koja kroz zadnjih nekoliko desetljeća pronalazi sve veću primjenu (Noda, 2015). U suštini, to je matematička metoda na temelju koje je moguće dobiti dodatne i potpunije informacije, koje inače nisu dostupne korištenjem konvencionalne jednodimenzijske spektroskopije (Noda, 2000).

Slika 1. predstavlja opću shemu 2D korelacijske spektroskopije. Kako je na shemi prikazano, na promatrani sustav, tj. uzorak, djeluje neka vanjska pobuda, npr. mehanička, električna, kemijska, termalna i dr., koje uzrokuju određene kemijske i/ili fizikalne promjene sustava. Na sustav djeluje i neki oblik elektromagnetskog zračenja (npr. UV, IR, NMR i dr.). Karakteristične interakcije između elektromagnetskog polja i komponenti uzorka pod vanjskom pobudom prikazuju se u vidu niza dinamičkih spektara (Noda 2000).

Dinamički spektri opisani su matematičkom jednadžbom:

$$\tilde{A}(v_j, t_i) = A(v_j, t_i) - \bar{A}(v_j),$$

gdje  $\bar{A}(v_j)$  predstavlja referentni spektar sustava. Za većinu sustava, referentni spektar je ili određeni stacionarni spektar ili prosječni spektar sustava (Noda, 2015). Dobiveni dinamički spektri se potom matematički transformiraju u skup 2D koreliranih spektara te slijedi njihova analiza (Noda, 2004).



**Slika 1.** Opća shema 2D korelacijske spektroskopije

### 2.1.1. Sinhroni 2D korelacijski spektar

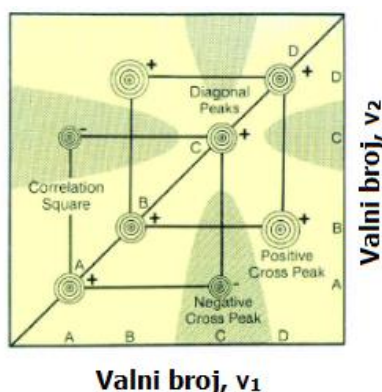
Jedan oblik 2D koreliranog spektra jest sinhroni 2D korelacijski spektar. Sinhroni korelacijski spektar,  $\Phi(v_1, v_2)$ , dan je jednadžbom:

$$\Phi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m \tilde{A}(v_1, t_i) \cdot \tilde{A}(v_2, t_i)$$

Ovaj oblik spektra predstavlja razinu sličnosti između dva spektralna intenziteta mjerena pri dva različita valna broja,  $v_1$  i  $v_2$  pod djelovanjem vanjske pobude  $t_i$ . Drugim riječima, sinhroni spektar predstavlja kovarijancu između dva spektralna intenziteta promatranih pri različitim valnim brojevima.

Slika 2. prikazuje općeniti oblik sinhronog 2D korelacijskog spektra. To je simetričan spektar u odnosu na glavnu dijagonalu  $v_1 = v_2$  (Noda, 2015). Na dijagonali su prikazani korelacijski maksimumi A, B, C i D, koji se nazivaju još i autokorelacijskim maksimumima. Autokorelacijski maksimumi predstavljaju osjetljivost tog dijela spektra na vanjsku pobudu, što rezultira promjenom spektralnog intenziteta. Izvan dijagonale vidljivo je još nekoliko maksimuma. Oni predstavljaju povezanost dvaju autokorelacijskih maksimuma te označavaju simultane ili slučajne promjene spektralnih intenziteta pri dva različita valna broja.

Iz slike 2. vidljivo je da su autokorelacijski maksimumi A i C u odnosu, jednako kao i autokorelacijski maksimumi B i D. Za lakše snalaženje, mogu se nacrtati takozvani korelacijski kvadrati između dva povezana autokorelacijska maksimuma i maksimuma koji ih povezuje. Za razliku od autokorelacijskih maksimuma, maksimumi izvan dijagonale mogu biti pozitivni ili negativni. Do pozitivnih signala na spektru će doći ukoliko se dva signala na koje se odnosi maksimum izvan dijagonale mijenjaju u istom smjeru, tj. ukoliko oba rastu, ili se oba smanjuju pod vanjskom pobudom. Sukladno tome, negativni maksimum izvan dijagonale upućuje na to da dok jedan signal raste, drugi se smanjuje pod vanjskom pobudom (Noda, 2000).



**Slika 2.** Sinhroni 2D korelacijski spektar (Noda, 2000)

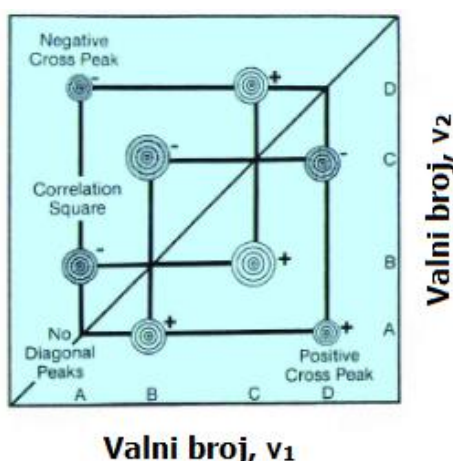
### 2.1.2. Asinhroni 2D korelacijski spektar

Za razliku od sinhronog, asinhroni 2D korelacijski spektar predstavlja korelaciju između sekvencijskih ili sukcesivnih promjena spektralnih intenziteta mjerenih pri  $\nu_1$  i  $\nu_2$ , a matematički se opisuje jednačinom:

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m \tilde{A}(\nu_1, t_i) \cdot \sum_{k=1}^m N_{ik} \tilde{A}(\nu_2, t_k).$$

Na slici 3. prikazan je primjer asinhronog 2D korelacijskog spektra. Iz primjera je vidljivo da na ovakvom spektru nema autokorelacijskih maksimuma, već se spektar sastoji isključivo od maksimuma izvan dijagonale te također mogu biti ili pozitivni ili negativni. Spektar je antisimetričan što znači da svaki maksimum iznad dijagonale ima svoj simetričan maksimum ispod dijagonale, ali suprotnog predznaka (Noda, 2015).

Iz primjera je također vidljivo da je su maksimumi A i B u korelaciji isto kao i maksimumi A i D, B i C te C i D. Do nastanka maksimuma na asinhronom 2D korelacijskom spektru dolazi samo ako su promjene dvaju spektralnih intenziteta međusobno izvan faze što je vrlo korisno prilikom razlikovanja dvaju ili više signala koji se u jednodimenzionalnom spektru inače preklapaju, a zapravo nisu u odnosu (Noda 2000).



**Slika 3.** Asinhroni 2D korelacijski spektar (Noda, 2000)



### **2.1.3. Heterospektralna 2D korelacija**

Osim osnovnog principa 2D korelacije gdje na sustav djeluje vanjska pobuda i elektromagnetsko zračenje, moguće je postaviti takve uvjete rada gdje na sustav djeluje i jedno ili više dodatnih elektromagnetskih zračenja. Samim time moguće je izvesti korelaciju tako da se jedan dinamički spektar nastao djelovanjem jednog zračenja na sustav uspoređuje s ostalim dinamičkim spektrima (Noda, 2004).

Takvim pristupom omogućeno je dobivanje dodatnih informacija koje u standardnoj 2D korelacijskoj spektroskopiji možda ne bi bile vidljive.

### **2.1.4. 2D korelacijska spektroskopija s pomičnim prozorom**

Metoda pomičnog prozora (MW-2D) varijanta je klasične 2D korelacijske spektroskopije. S obzirom da interpretacija 2D korelacijskih spektara ponekad može biti zahtjevna uslijed prevelike količine podataka, razvijena je metoda kojom se prikupljeni podaci dijele u manje blokove (podskupove), koji su jednake veličine, ali su im počeci pomaknuti za određeni broj spektara, najčešće za jedan spektar. Dobiveni podskupovi spektara zasebno se analiziraju 2D korelacijskom spektroskopijom, pri čemu se od dobivenih 2D korelacijskih spektara zadržavaju samo autokorelacijski spektri te prikazuju u obliku 2D korelacijske mape (Kaddour i sur., 2007).

## **2.2. PRIMJENA DVODIMENZIJSKE KORELACIJE U ANALITICI HRANE**

### **2.2.1. Mlijeko u prahu**

#### *2.2.1.1. Utjecaj povišene temperature na komponente mlijeka u prahu*

Mlijeko u prahu ima široku primjenu jer se lako transportira i skladišti. S obzirom na njegov sastav koji uključuje masti, proteine i ugljikohidrate (u najvećem dijelu laktozu), bitno je poznavati osjetljivost pojedinih komponenti na povišenu temperaturu.

Zhou i suradnici su za različite vrste mlijeka u prahu (punomasno, zaslađeno punomasno, malomasno i obrano mlijeko u prahu) snimili FT-IR spektre. U drugom dijelu eksperimenta promatrala se ovisnost sastava mlijeka u prahu o temperaturi. U tu svrhu su se

uzorci mlijeka u prahu zagrijavali u temperaturnom intervalu od 30 °C do 80 °C te su izvedeni sinhroni i asinhroni 2D korelacijski spektri.

Sinhroni i asinhroni spektri, osim što ukazuju na povezanost pojedinih komponenti, također daju informaciju o tome na kojoj komponenti će se promjena uslijed vanjske pobude dogoditi prije. Uzimajući u obzir samo proteine i ugljikohidrate na korelacijske spektrima punomasnog i zaslađenog mlijeka u prahu, vidljivo je da će do promjena uslijed povišene temperature prvo doći na proteinima, pa zatim na laktozi kod punomasnog mlijeka u prahu, a kod zaslađenog mlijeka u prahu prvo dolazi do promjena na saharozi, pa tek onda na proteinima.

S druge strane, ako se uspoređuju uzorci s obzirom na sastav masti, iz korelacijskih spektara punomasnog i malomasnog mlijeka u prahu, vidljivo je da do promjena prvo dolazi na proteinima, a potom na ugljikohidratima. Kod obranog mlijeka je obrnut redoslijed, prvo dolazi do promjene na ugljikohidratima, a potom na proteinima.

Iz svega navedenoga postoji mogućnost da povišeni udio saharoze i masti utječe na promjene na laktozi uslijed povišene temperature, ali za tu hipotezu je potrebno provesti daljnja istraživanja (Zhou i sur., 2006).

#### 2.2.1.2. *Patvorenje mlijeka u prahu*

Mlijeko i mliječni proizvodi sastavni su dio ljudske prehrane od najranije dobi. Mlijeko u prahu glavni je sastojak nadohrane za dojenčad te mnogih mliječnih proizvoda. Kako bi se smanjili troškovi proizvodnje ili prikrili neki nedostaci, vrlo često je patvorenje mlijeka u prahu. Unazad nekoliko godina, na kineskom tržištu pojavila su se dva slučaja patvorenja mlijeka u prahu, jedan dodatkom kristalizirane laktoze, drugi dodatkom melamina.

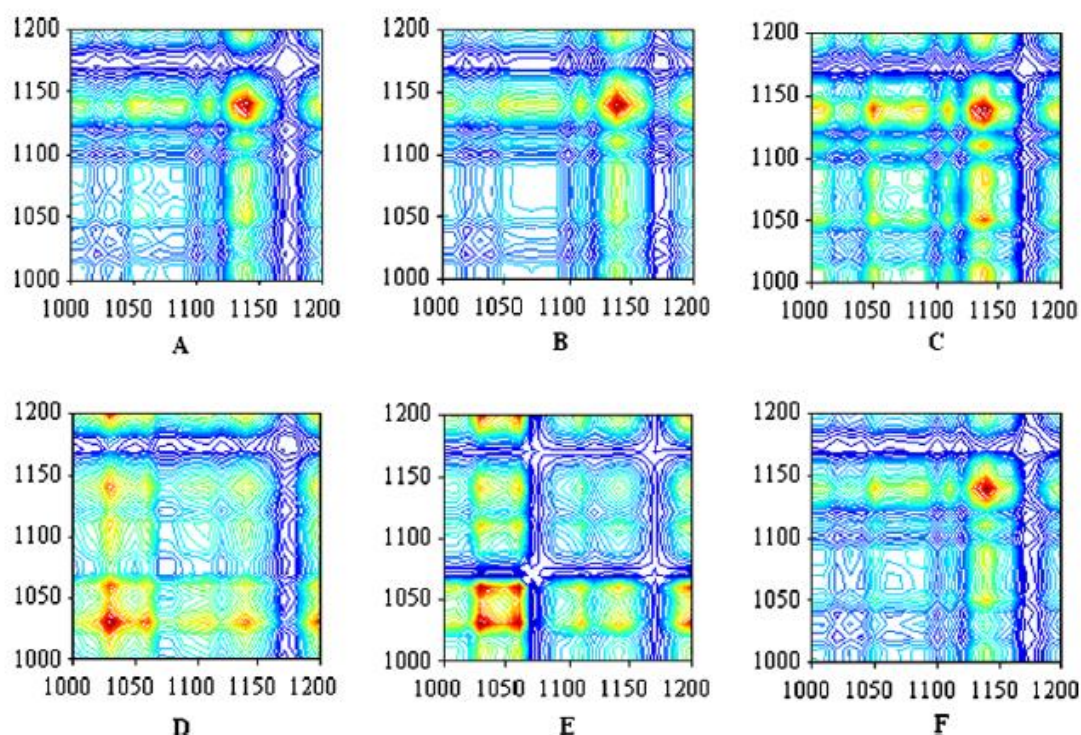
Tradicionalni način utvrđivanja patvorenja mlijeka u prahu kristaliziranom laktozom je kompleksan te su znanstvenici s pekinškog sveučilišta razvili jednostavnu, nedestruktivnu metodu za analiziranje sastava mlijeka u prahu.

U svom istraživanju koristili su infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom. Tom metodom snimili su spektre čistog mlijeka bez dodane laktoze, kojeg su koristili kao referencu, te spektre mlijeka u kojima je dodavana kristalizirana laktoza u udjelima od 10 do 90 %. Također, snimljeni su i spektri za pet uzoraka nadohrane za novorođenčad komercijalno dostupnih na kineskom tržištu.

Usporedbom FT-IR spektara već je bilo moguće utvrditi da su prva tri uzorka patvorena kristaliziranom laktozom. Dodatna potvrda je dobivena 2D korelacijskom spektroskopijom, koja, između ostaloga, može pružiti i dodatne informacije kao što su količina dodane kristalizirane laktoze. Dinamički spektar je dobiven podvrgavanjem uzorka različitim

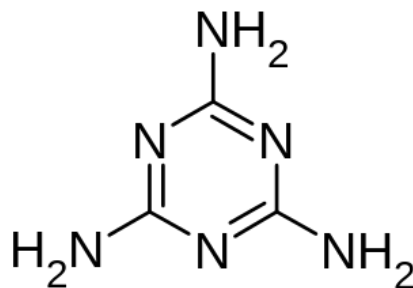
temperaturama u rasponu od 50 do 120 °C. Time je dobiven sinhroni 2D spektar (slika 4.) iz kojega je vidljivo da prva tri uzorka imaju gotovo identičan spektar kao i referentni uzorak s dodanom laktozom.

Izračunavanjem korelacijskog koeficijenta za svaki uzorak mlijeka u prahu s dodanom laktozom i uzorke nadohrane za dojenčad te njihovim uspoređivanjem, utvrđeno je da uzorak A sadrži oko 10 % kristalizirane laktoze, uzorak B između 10 i 20 %, a uzorak C oko 20 % (Lei,Y. i sur., 2010).



**Slika 4.** Sinhroni spektri A, B, C, D i E uzoraka mlijeka u prahu te sinhroni spektar referentnog uzorka (Lei, Y. i sur., 2010)

S druge strane, melamin (slika 5.) je dodavan u mlijeko i mliječne proizvode kako bi se u analizama kvalitete prividno povećala razina dušika. Budući da se ispostavilo da melamin predstavlja opasnost za zdravlje ljudi, poglavito djece koja su konzumirala nadohranu, bilo je iznimno važno razviti brzu, jeftinu i pouzdanu metodu za njegovu detekciju u mlijeku i mliječnim proizvodima.



**Slika 5.** Strukturna formula melamina (izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Melamine>)

Slično kao i u analizi mlijeka u prahu patvorenog kristaliziranom laktozom, pripremljeno je osam uzoraka mlijeka u koje su dodavane različite koncentracije melamina. Uzorci su analizirani IR i NIR spektroskopijom te su spektri uspoređeni sa spektrima čistog mlijeka.

Na spektrima nije bilo značajnije razlike te je primijenjena 2D korelacijska spektroskopija gdje je kao vanjska pobuda korištena različita koncentracija melamina. Iz sinhronog 2D IR korelacijskog spektra vidljiva su dva snažna autokorelacijska maksimuma, koja su povezana s dva pozitivna maksimuma izvan dijagonale što potvrđuje da ta dva autokorelacijska maksimuma imaju isto porijeklo. Autokorelacijski maksimumi odgovaraju melaminu.

Iz 2D NIR korelacijskog spektra vidljiv je samo jedan autokorelacijski maksimum. Za dodatnu potvrdu, napravljena je i heterospektralna 2D IR – NIR spektroskopija. Analizom tog spektra potvrđeno je da sva tri signala vidljiva na pojedinim 2D korelacijskim spektrima odgovaraju melaminu.

Ovime je razvijena pogodna analitička metoda za detektiranje melamina u mlijeku i mliječnim proizvodima (Yang, R. i sur., 2012).

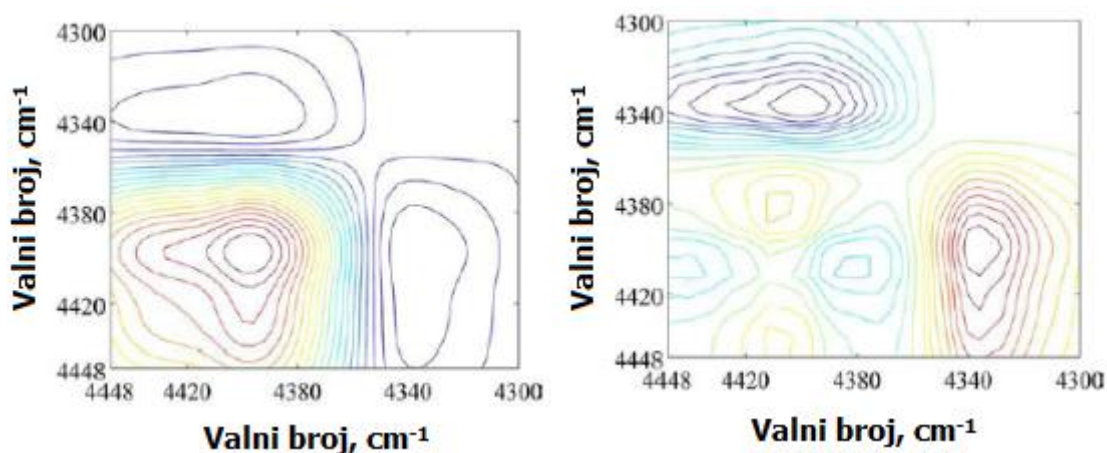
### 2.2.2. Alkoholna pića

Neodležana jaka alkoholna pića konzumiraju se diljem svijeta. U cilju povećanja profita, proizvođači vrlo često u piće dodaju metanol. Metanol sam po sebi nije toksičan za ljude, ali u organizmu se on raspada na formaldehid i mravlju kiselinu koji mogu uzrokovati ozbiljne posljedice na ljudsko zdravlje. Samim time je potrebno precizno odrediti je li i u kojoj količini je metanol dodan u pojedino jako alkoholno piće.

Do nedavno su se u tu svrhu koristile tradicionalne metode određivanja, ali takve metode su skupe, dugo traju i zahtijevaju puno rada. Iz tog razloga, kineski znanstvenici su ispitivali djelotvornost 2D korelacijske spektroskopije za utvrđivanje dodanog metanola.

Kada su uspoređivali 1D NIR spektar čistog metanola i 1D NIR spektar jakog alkoholnog pića, znanstvenici su vidjeli promjenu na spektru, ali uslijed preklapanja karakterističnih maksimuma jakog alkoholnog pića i metanola, nisu mogli donijeti konkretan zaključak.

Snimanjem sinhronog i asinhronog 2D korelacijskog NIR spektra jakog alkoholnog pića s različitim koncentracijama dodanog metanola kao vanjska pobuda (slika 6.), znanstvenici su uspjeli vidjeti karakteristične maksimume metanola i jakog alkoholnog pića. Samim time ova metoda za detekciju patvorenja jakih alkoholnih pića metanolom se može smatrati adekvatnom (Yang i sur., 2016).

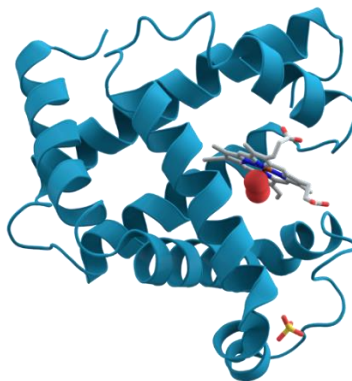


**Slika 6.** Sinhroni i asinhroni 2D korelacijski NIR spektri jakog alkoholnog pića s dodanim metanolom (Yang i sur., 2016)

### 2.2.3. Meso

Japanski znanstvenik Yongliang Liu je sa svojim timom tijekom 2000. i 2001. godine proveo niz istraživanja na pilećem mesu. Radovi se temelje na određivanju kvalitete mesa pri različitim uvjetima, kao što su termička obrada, hladno skladištenje ili odmrzavanje zamrznutog mesa, te identifikaciji fizikalno-kemijskih promjena do kojih dolazi uslijed tih uvjeta. Glavni parametri koji su se promatrali prilikom istraživanja su boja i tekstura mesa.

Boja mesa je glavni kriteriji na temelju kojega potrošači procjenjuju kvalitetu mesa, a određena je količinom pigmenta mioglobina (slika 7.) na površini mesa. Boja će varirati ovisno o tome koliki je udio pojedinog oblika mioglobina, deoksimioglobina, oksimioglobina i metmioglobina. Jedan oblik mioglobina prelazi u drugi procesima oksigenacije, oksidacije i redukcije. Također mogu ulaziti i u reakcije s ostalim komponentama mesa, kao što su lipidi i sumorovodik kojeg stvaraju bakterije.



**Slika 7.** Struktura mioglobina s prikazanim aktivnim mjestom (hem)  
(izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Myoglobin>)

Do promjene teksture dolazi uslijed degradacije proteina proteolizom, a do lipidne oksidacije djelovanjem enzima lipooksidaze. Lipidnom peroksidacijom do koje dolazi uslijed djelovanja enzima lipooksidaze nastaju hidroperoksidi i radikali, koji uzrokuju daljnju oksidaciju i degradaciju proteina i lipida te obezbojenje mesa (Liu i sur., 2000c).

#### 2.2.3.1. *Utjecaj povišene temperature na promjene boje i teksture pilećeg mesa*

U svojem prvom radu, Liu i suradnici su promatrali utjecaj povišene temperature na pileće meso. Zagrijavanjem pilećeg mesa prilikom kuhanja dolazi do značajnih promjena u izgledu te fizikalnim svojstvima. Dvije vidljive promjene uključuju promjenu boje te očvršćivanje mesa. Liu i suradnici su korištenjem 2D korelacijske spektroskopije proučavali promjene prilikom termičke obrade pilećeg mesa.

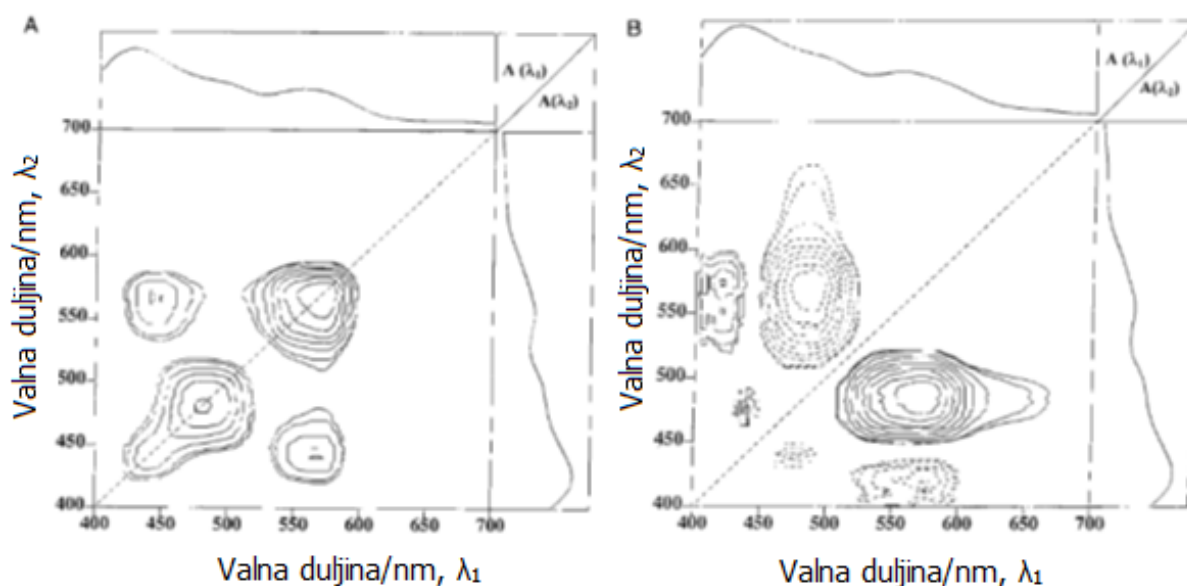
Iz sinhronih i asinhronih 2D korelacijskih spektara u vidljivom i NIR području spektra ustanovljeno je da najprije dolazi do denaturacije i oksidacije deoksimioglobina i oksimioglobina u metmioglobin. Detaljnijom analizom asinhronog spektra vidljivo je da ta promjena započinje oksidacijom C – H veza u hem grupama oksimioglobina i deoksimioglobina (Liu i sur., 2000a).

#### 2.2.3.2. *Povezanost zdravstvene ispravnosti i boje pilećeg mesa*

U ovome radu korištena je 2D korelacijska spektroskopija u vidljivom području, a svojevrsnu "vanjsku pobudu" predstavljali su različiti uzorci pilećeg mesa.

U istraživanju je otkriveno da su pigmenti deoksimioglobin i oksimioglobin prisutni zajedno s metmioglobinom kod zdravstveno ispravnog i neispravnog mesa (slika 8.), ali u različitim odnosima. Drugim riječima, više metmioglobina nalazilo se u mesu zahvaćenom

nekom bolešću, nego u zdravstveno ispravnom mesu te onom mesu koje nije pravilno iskrvareno (Liu i sur., 2000b).



**Slika 7.** Sinhroni (a) i asinhroni (b) spektar zdravstveno ispravnog i neispravnog mesa (Liu i sur., 2000b)

#### 2.2.3.3. Utjecaj hladnog skladištenja na fizikalno-kemijska svojstva pilećeg mesa

Prilikom hladnog skladištenja mesa dolazi do promjene boje mesa, promjene teksture i lipidne peroksidacije.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost između fizikalnih, kemijskih i biokemijskih promjena do kojih dolazi prilikom hladnog skladištenja mesa. U tu svrhu uzeto je sedam različitih uzoraka hladno skladištenog pilećeg mesa te su se promjene na njemu pratile Vis i NIR spektroskopijom kroz 18 dana.

Proučavanjem 2D korelacijskih spektara u vidljivom području primijećeno je da prilikom hladnog skladištenja dolazi do smanjenja udjela deoksioglobina i oksimoglobina, što je povezano s promjenom boje. Također, na spektrima je vidljiv i porast sulfmoglobina, derivata mioglobina nastalog reakcijom mioglobina i sumporovodika kojeg proizvode bakterije. Sumporovodik se lako veže na oksimoglobin te na metmioglobin, ali teže na oksimoglobin.

S druge strane, 2D korelacijski spektri u NIR području objašnjavaju promjene teksture na mesu tijekom termičke obrade i hladnog skladištenja. Prilikom termičke obrade najprije dolazi do pojave maksimuma koji odgovaraju vibracijama C–H veza, a tek onda do pojave maksimuma koji odgovaraju O–H i N–H vezama. Kod hladnog skladištenja mesa je situacija obrnuta, prvo dolazi do vibracije O–H i N–H veza, a potom C–H. To upućuje da kod termičke

obrade mesa prvo dolazi do oksidacije lipida, a kod hladnog skladištenja do denaturacije i proteolize proteina (Liu i sur., 2000c).

#### *2.2.3.4. Utjecaj odmrzavanja na fizikalno – kemijska svojstva pilećeg mesa*

U zadnjem istraživanju spomenuti autori su proučavali promjene do kojih dolazi prilikom odmrzavanja mesa. Proučavanjem 2D korelacijskih spektara u vidljivom području, zaključeno je da dolazi do relaksacije deoksioglobina i oksimoglobina te do razgradnje metmioglobina i sulfmioglobina na manje molekule.

Iz asinhronih spektara je vidljivo da odmrzavanjem najprije dolazi do razgradnje metmioglobina i sulfmioglobina, a potom do relaksacije deoksioglobina i oksimoglobina. 2D korelacijski spektri u NIR području otkrivaju da otapanje kristala leda te relaksacija i proteoliza proteina prethode relaksaciji lipida (Liu i sur., 2001).

### **2.2.4. Žitarice**

#### *2.2.4.1. Utjecaj miješanja na fizikalno-kemijska svojstva tijesta*

Miješanje tijesta je iznimno važna faza u procesu proizvodnje kruha. Sam proces je ključan za kvalitetu kruha s obzirom da prilikom miješanja dolazi do velikog broja fizikalnih i kemijskih promjena (Kaddour i sur., 2007).

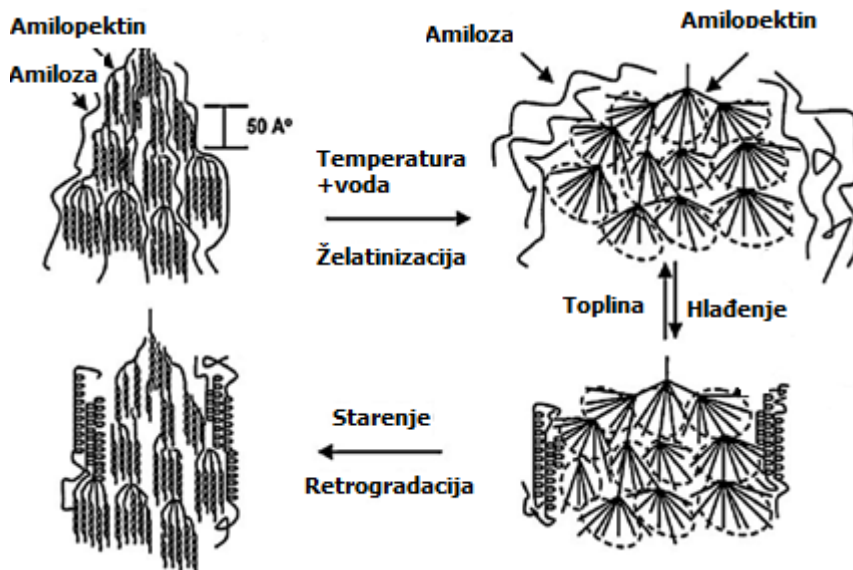
Kaddour i suradnici su se poslužili 2D korelacijskom spektroskopijom u NIR području, uključujući i metodom pomičnog prozora (MW-2D), kako bi opisali koje sve fizikalno-kemijske promjene utječu na formiranje tijesta miješanjem. Proučavanjem asinhronog 2D korelacijskog spektra u NIR području primijećeni su pomaci u položaju maksimuma, što je pripisano slobodnoj vodi u tijestu i sekundarnim modifikacijama strukture proteina. Služeći se MW-2D korelacijom utvrđeno je da nakon što se postigne optimalna konzistencija tijesta, preostale značajne reakcije tijekom miješanja su modifikacije interakcija između glutena i vode (You i sur., 2015).

#### *2.2.4.2. Retrogradacija škroba*

Glavni sastojak pšeničnog brašna je škrob s udjelom od 60 do 75 %. Škrob se sastoji od dvije komponente, amiloze i amilopektina. Prilikom procesa proizvodnje kruha dolazi do želatinizacije škroba uslijed povišene temperature te se gubi molekulska uređenost i kristaliničnost škroba. Hlađenjem i starenjem kruha dolazi do retrogradacije škroba, čime



ponovno nastaje uređenija, kristalinična struktura (slika 9.). Retrogradacija amiloze nastupa tijekom hlađenja, dok do retrogradacije amilopektina dolazi kroz nekoliko dana (Piccinini i sur., 2011).



**Slika 9.** Želatinizacija i retrogradacija škroba

(izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Figure-23-Schematic-representations-of-starch-gelatinization-and-retrogradation-a\\_fig4\\_311463736](https://www.researchgate.net/figure/Figure-23-Schematic-representations-of-starch-gelatinization-and-retrogradation-a_fig4_311463736))

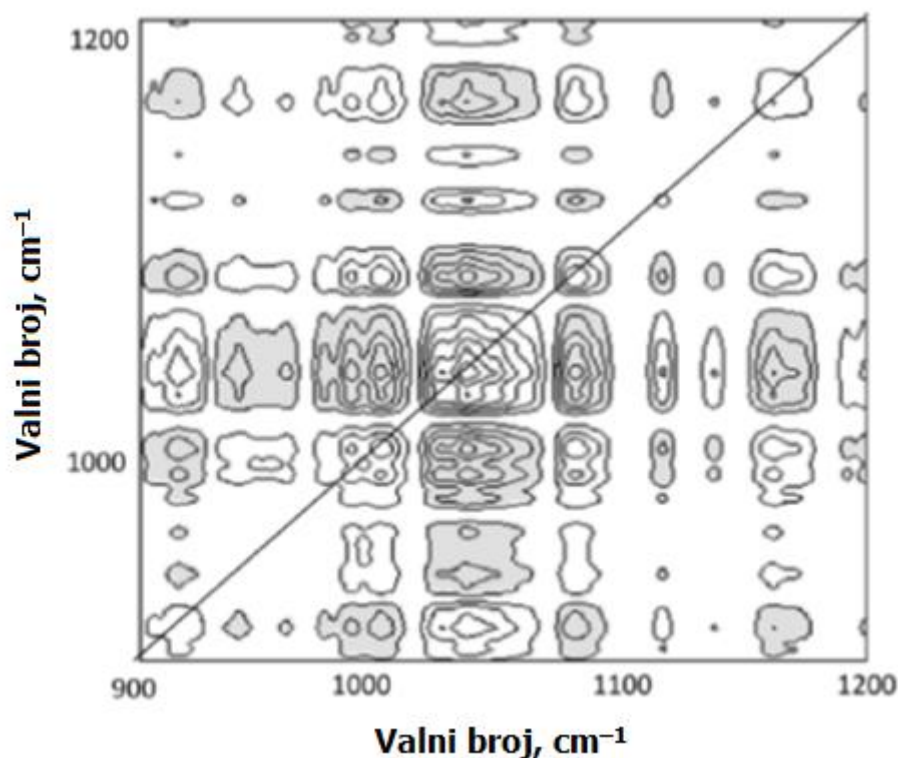
Piccinini i sur. su primjenom 2D korelacijske Ramanove spektroskopije analizirali degenerativne promjene škroba koristeći vrijeme skladištenja kruha kao svojevrsnu "vanjsku pobudu". U svojem istraživanju su dokazali da zaista tijekom skladištenja kruha kroz određeno vrijeme dolazi do ponovnog uspostavljanja kristalinične strukture, koja se može pripisati retrogradaciji amilopektina (You i sur., 2015).

#### 2.2.4.3. Želatinizacija i retrogradacija ječmenog škroba

Australski znanstvenici koristili su 2D korelacijsku MIR spektroskopiju kako bi mogli bolje proučiti želatinizaciju i retrogradaciju ječmenog škroba te ustanoviti njihovu povezanost s kvalitetom ječmenog slada.

Uzorci su dobiveni namakanjem ječma u vodi. Ječam namakanjem otpušta gel koji je onda analiziran MIR spektroskopijom. Rezultati 2D korelacijske MIR spektroskopije (slika 10.) su pokazali da je netopljivost hidrokoloida potencijalno uzrokovana želatinizacijom i polimerizacijom škroba te interakcijom između oligosaharida i polimera s drugim komponentama kao što su lipidi. Samim time primjena 2D korelacijske spektroskopije u

određivanju karakteristika pojedinih varijeteta ječma za dobivanje slada bi potencijalno mogla biti vrlo korisna (Cozzolino i sur, 2014).



**Slika 10.** Sinhroni 2D korelacijski MIR spektar geliranih uzoraka ječma (Cozzolino i sur., 2014)

## 2.2.5. Jabuke

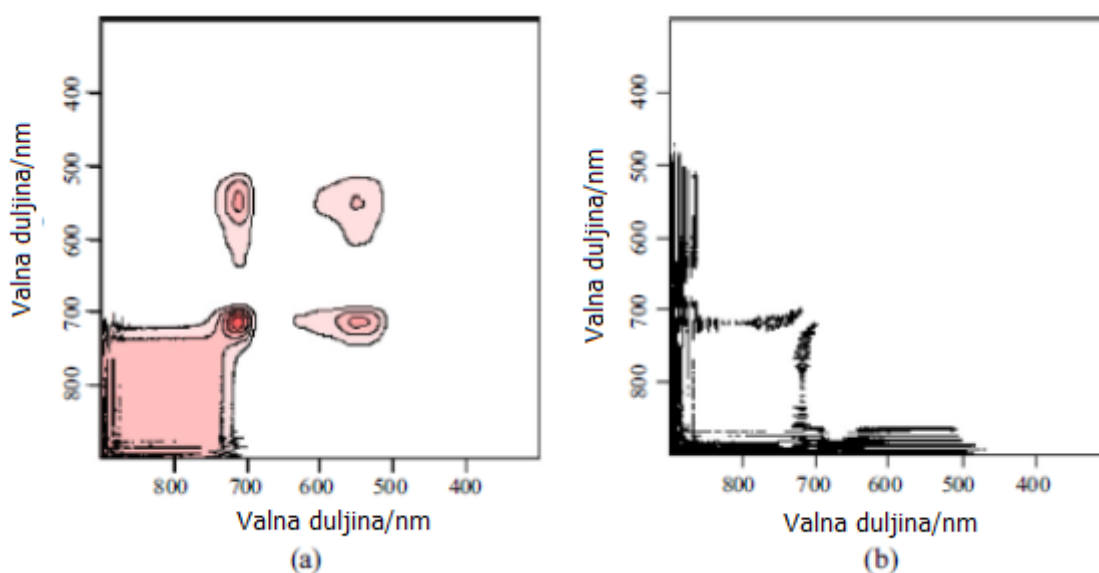
### 2.2.5.1. Sadržaj šećera u jabukama

Slatkoća je jedan od glavnih pokazatelja kvalitete jabuka. Nakupljanje šećera u plodovima je blisko povezano s rastom i razvojem drveta u različitim fazama. U cilju određivanja povezanosti rasta drveta sa sadržajem šećera u jabukama, znanstvenici s pekinškog agronomskog fakulteta proveli su 2D korelacijsku spektroskopiju listova jabuke u vidljivom i NIR području. Listovi su sakupljeni u različitim fazama rasta.

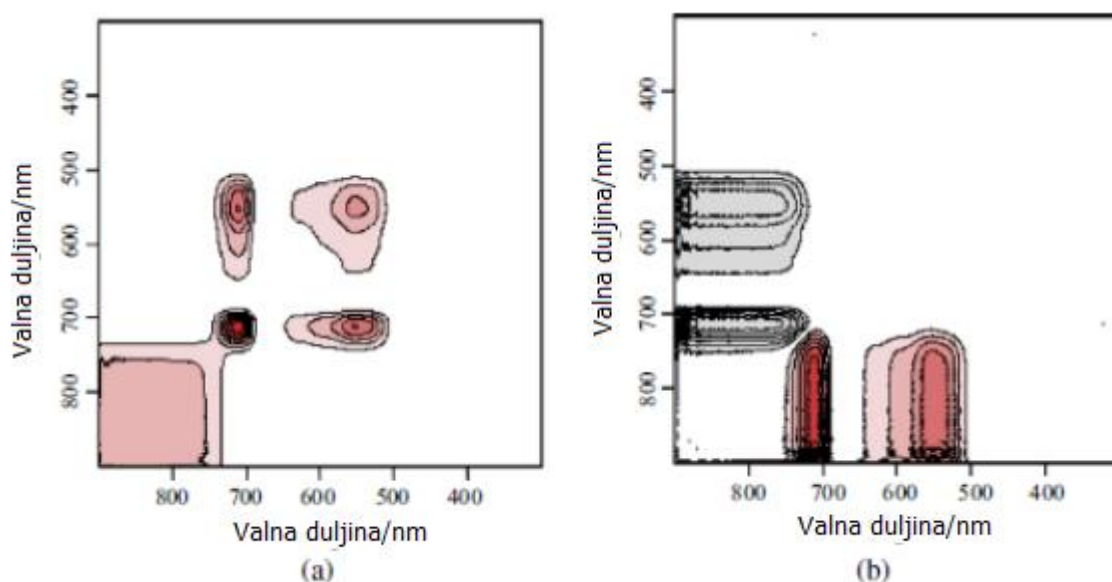
Količina šećera u jabukama se određivala refraktometrijom te je ona služila kao vanjska pobuda. Promatranjem sinhronih i asinhronih spektara svih šest faza rasta, vidljiv je karakterističan maksimum koji odgovara sadržaju šećera. Intenzitet maksimuma se mijenja

ovisno o količini šećera u pojedinim fazama te je najjači intenzitet u fazi rasta pupoljka (slika 11.) te u fazi stabilizacije ploda (slika 12.).

Ovim istraživanjem je utvrđeno da postoji povezanost između sadržaja šećera u jabukama i lišću, tj. da sadržaj šećera u jabukama ovisi o fiziološkim fazama rasta drveta (Zhang i sur., 2015).



**Slika 11.** Sinhroni (a) i asinhroni (b) 2D korelacijski spektar lišća jabuke u fazi rasta pupoljka (Zhang i sur., 2015)



**Slika 12.** Sinhroni (a) i asinhroni (b) 2D korelacijski spektar lišća jabuke u fazi stabilizacije (Zhang i sur., 2015)

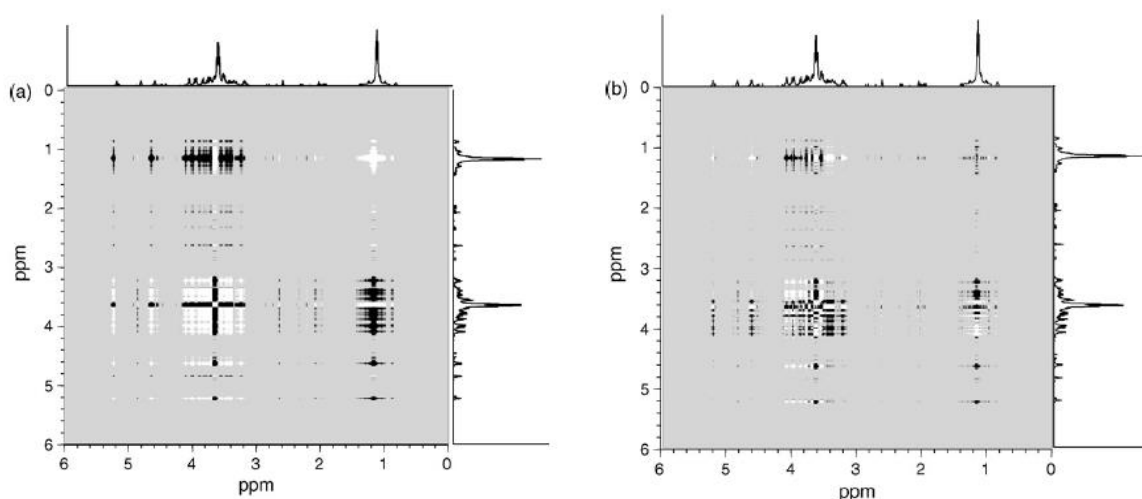
## 2.2.6. Vino

### 2.2.6.1. Promjene tijekom fermentacije vina

Proces fermentacije vina je kompleksni biokemijski proces. Iako je proces fermentacije u načelu dobro poznat, znanstvenici su korištenjem 2D korelacijske spektroskopije željeli dobiti bolji uvid u sam tijek reakcija koji se događaju prilikom fermentacije.

Prvi takav eksperiment proveden je korištenjem 2D korelacijske FT-IR spektroskopije. Uzorci su sakupljeni svakodnevno kroz 31 dan fermentacije te su im snimani FT-IR spektrometri. Iz 2D korelacijskih spektara je utvrđeno da je konverzija glukoze u etanol brža nego konverzija fruktoze u etanol (Wynne i sur., 2007).

Godinu kasnije proveden je sličan eksperiment korištenjem 2D korelacijske NMR spektroskopije. Ovakav pristup pružio je dodatne informacije. Iz sinhronog korelacijskog spektra (slika 13a) vidljivo je da smanjenjem koncentracije fruktoze i glukoze raste količina etanola, octene kiseline i jantarne kiseline. Također, u skladu s prethodnim istraživanjem, iz asinhronog korelacijskog spektra (slika 13b) vidljivo je da je konverzija glukoze u etanol brža od konverzije fruktoze u etanol te da je brža konverzija glukoze u etanol nego što je to produkcija etanola (Kirwan i sur., 2008).



**Slika 13.** Sinhroni (a) i asinhroni (b) spektar 2D NMR korelacije prilikom fermentacije vina (Kirwan i sur., 2008)

#### 2.2.6.2. *Analiza kvalitete vina*

Vino se prema sadržaju neprevrelog šećera dijeli na suho, polusuho, poluslatko i slatko vino. Uobičajeno se sadržaj neprevrelog šećera određuje mjerenjem gustoće vina, plinskom kromatografijom, titracijom ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. S obzirom da te metode zahtijevaju dug laboratorijski rad te da uzorak vina nakon provedene metode ne ostaje nepromijenjen, bilo je potrebno pronaći brzu i efikasnu metodu za određivanje količine neprevrelog šećera u vinima.

Zhang i sur. poslužili su se 2D korelacijskom IR spektroskopijom. Za svoj rad koristili su 120 uzoraka vina te 10 standarda od različitih proizvođača vina. Proučavanjem sinhronih i asinhronih spektara vina znanstvenici su lako mogli vidjeti razliku između pojedinih skupina vina obzirom na sadržaj neprevrelih šećera jer maksimumi koji odgovaraju šećerima i alkoholu za različite skupine imaju drugačiji intenzitet.

Nadalje, znanstvenici su uvidjeli da se spektri za istu vrstu vina od različitih proizvođača značajno razlikuju što upućuje da kvaliteta vina značajno ovisi o samom procesu proizvodnje. Ovim istraživanjem je dokazano da se 2D korelacijska spektroskopija može upotrijebiti kao zadovoljavajuća metoda u analizi sastava i kvalitete vina (Zhang i sur., 2010).

### **3. ZAKLJUČAK**

Dvodimenzijska korelacijska spektroskopija se do sada pokazala kao vrlo djelotvorna metoda u analitici hrane. To je jeftina, brza i pouzdana metoda koja pruža veći broj informacija i lakšu interpretaciju dobivenih spektara. Iako za sada 2D korelacijska spektroskopija ima veću primjenu na području kemijske industrije, sve više znanstvenika je počinje primjenjivati u svojim istraživanjima na području analitike hrane.

Iako jest vrlo djelotvorna u analitici hrane, potreban je dodatan razvoj metode čime bi se omogućilo istraživanje kompleksnijih i zahtjevnijih sustava.

## 4. LITERATURA

Cozzolino, D., Roumeliotis, S., Eglinton, J. (2014) An attenuated total reflectance mid infrared (ATR – MIR) spectroscopy study of gelatinization in barley. *Carbohydrate Polymers* **108**: 266 – 271

Kaddour, A., A., Barron, C., Robert, P., Cuq, B. (2007) Physico – chemical description of bread dough mixing using two – dimensional near – infrared correlation spectroscopy and moving – window two – dimensional correlation spectroscopy. *Journal of Cereal Science* **48**: 10 – 19

Kirwan, G. M., Clark, S., Barnett, N. W., Niere, J.O., Adams, M. J. (2008) Generalised 2D – correlation NMR analysis of a wine fermentation. *Analytica Chimica Acta* **629**: 128 – 135

Lei, Y., Zhou, Q., Zhang, Y., Chen, J., Sun, S., Noda, I. (2010) Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier – transform infrared spectroscopy combined with two – dimensional correlation infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **974**: 88 – 93

Liu, Y., Chen, Y., Ozaki, Y. (2000a) Two -Dimensional Visible/Near – Infrared Correlation Spectroscopy Study of Thermal Treatment of Chicken Meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 901 – 908

Liu, Y., Chen, Y., Ozaki, Y. (2000b) Characterization of Visible Spectral Intensity Variations of Wholesome and Unwholesome Chicken Meats with Two – Dimensional Correlation Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **54**, 587 – 594

Liu, Y., Ozaki, Y. (2000c) Two – Dimensional Correlation Spectroscopy Study of Visible and Near – Infrared Spectral Variations of Chicken Meats in Cold Storage. *Applied Spectroscopy* **54**: 1458 – 1470

Liu, Y., Chen, Y. (2000d) Two – Dimensional visible/near – infrared correlation spectroscopy study of thawing behavior of frozen chicken meats without exposure to air. *Meat Science* **57**: 299 – 310

McGorin, R. J. (2009) One Hundred Years of Progress in Food Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 8076 – 8088

Nielsen. S. S., (2017) Food Analysis, 5. izd., Springer International Publishing, str. 4 – 8

Noda, I., Dowrey, A. E., Marcott, C., Story, G. M. (2000) General Two – Dimensional Correlation Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **54**: 236 – 248

Noda, I., Ozaki, Y. (2004) Two – Dimensional Correlation Spectroscopy – Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy, 1. izd., John Wiley & Sons, Ltd., str. 15 – 23

Noda, I. (2015) Techniques of two – dimensional (2D) correlation spectroscopy useful in life science research. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* **4**: 109 – 127

Piccinini, M., Fois, S., Secchi, N., Sanna, M., Roggio, T., Catzeddu, P. (2012) The Application of NIR FT – Raman Spectroscopy to Monitor Starch Retrogradation and Crumb Firmness of Semolina Bread. *Food Analytical Methods* **5**: 1145 – 1149

Research Gate, <[https://www.researchgate.net/figure/Figure-23-Schematic-representations-of-starch-gelatinization-and-retrogradation-a\\_fig4\\_311463736](https://www.researchgate.net/figure/Figure-23-Schematic-representations-of-starch-gelatinization-and-retrogradation-a_fig4_311463736)> Pristupljeno: 20. lipnja 2018.

Wikipedia, <<https://en.wikipedia.org/wiki/Melamine>> Pristupljeno: 17. lipnja 2018.

Wikipedia, <<https://en.wikipedia.org/wiki/Myoglobin>> Pristupljeno: 27. lipnja 2018.

Wynne, L., Clark, S., Adams, M. J., Barnett, N. W. (2007) Compositional dynamics of a commercial wine fermentation using two – dimensional FTIR correlation analysis **44**: 394 – 400

Yang, R., Liu, R., Xu, K. (2012) Determination of Melamine of Milk Based on Two – dimensional Correlation Infrared Spectroscopy. *Proc. of SPIE* **8229**: 18-1 – 18-6

Yang, Y. R., Ren, Y. F., Dong, G. M., Yang, R. J., Liu, H. X., Du, Y. H., Zhang, W. Y. (2016) Determination of Methanol in Alcoholic Beverages by Two – Dimensional Near – Infrared Correlation Spectroscopy. *Analytical Letters* **49**: 2279 – 2289

You, Z., Zhuo, L., Yang, X., Hong, H., Liu, Z., Gong, Z., Cheng, F. (2015) Food Research Applications of Two – Dimensional Correlation Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* **50**: 840 – 858

Zhang, Y., Chen, J., Lei, Y., Zhou, Q., Sun, S., Noda, I. (2010) Discrimination of different red wine by Fourier – transform infrared and two – dimensional infrared correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **974**: 144 – 150

Zhang, Y., Zheng, L., Li, M., Deng, X., Ji, R. (2015) Predicting apple sugar content based on spectral characteristics of apple tree leaf in different phenological phases. *Computers and Electronics in Agriculture* **112**: 20 – 27

Zhou, Q., Sun, S., Yu, L., Xu, C., Noda, I., Zhang, X. (2006) Sequential changes of main components in different kinds of milk powders using two – dimensional infrared correlation analysis. *Journal of Molecular Structure* **799**: 77 – 84



## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Lidija Salkić

Ime i prezime studenta